

Aus der I. Inneren Abteilung des
Städtischen Krankenhauses Neukölln
Chefarzt: Professor Dr. med. Klaus Holidack

DIE EINWIRKUNG VON STILBAMIDIN AUF
PLASMOCYTOMZELLEN IN VITRO

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Elke Schuldt

aus Rostock

1967

Aus der I. Inneren Abteilung des
Städtischen Krankenhauses Neukölln
Chefarzt: Professor Dr. med. Klaus Holldack

DIE EINWIRKUNG VON STILBAMIDIN AUF
PLASMOCYTOMZELLEN IN VITRO

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Elke Schuldt
aus Rostock

Dekan: Professor Dr. med. Alfred N. W i t t

Referent: Priv.Do. Dr. med. Irene B o l l

Korreferent: Professor Dr. med. Max S c h w a b



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 26. April 1967

Stilbamidin wird zur Gruppe der cytostatischen Pharmaka gezählt.

Den Begriff der Cytostatica führte HEILMEYER (22) ein. Er bezeichnet damit Zellgifte, die sowohl den Kern als auch die Bestandteile des Plasmas schädigen können, jedoch bevorzugt den Kern treffen. In hohen Konzentrationen wirken sie zelltötend, in niederen hemmen sie die Zellteilung. Die Empfindlichkeit der Zellen gegen Cytostatica ist bei starker Proteinsynthese größer. Als unspezifische Proliferationsgifte beeinflussen die Cytostatica aber nicht nur die neoplastisch wuchernden Zellen, sondern schädigen auch normales Gewebe mit großer Proliferationsaktivität, wie das hämatopoetische System, die Keimdrüsen, die Schleimhäute, das Epithel der Haarwurzeln und Nagelbetten. HEILMEYER teilt die Cytostatica nach ihrem Angriffspunkt ein in

1. Mitosegifte

2. Interphasengifte

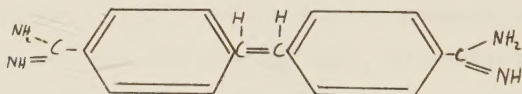
1. Die Mitosegifte greifen direkt in den Ablauf der Mitosen ein. Durch Verhinderung der Spindelbildung fixieren sie die Mitose im Stadium der Metaphase und erhöhen damit im fixierten Präparat den Mitoseindex. Der Hauptvertreter dieser Gruppe ist das Colchicin.

2. Die Interphasengifte greifen den Ruhekern an. Ihre Wirkung, die der der Röntgenstrahlen entspricht, kommt erst in der folgenden Mitose zum Ausdruck. Die Mitosehäufigkeit nimmt ab, in fixierten Präparaten

wird der Mitoseindex gesenkt . Nach BIESELE (6) hängt die Wirksamkeit der Cytostatica von dem Vorhandensein bifunktioneller Gruppen ab . Eine Parastellung dieser Gruppen im Grundmolekül soll die Wirkung noch begünstigen . Als bifunktionelle Gruppen der Cytostatica reagieren die β - chloraethyl -, Polyäthylenimin -, Di-Epoxyd - und die Dimethansulfonsäurekomponente.

Zu den Äthyleniminen gehören Stilbamidin , Pentamidin etc.. Stilbamidin ist der zweiwertige Phenolabkömmling mit der Strukturformel :

4,4 - Diamidinostilben



Therapeutisch verwendeten v. JANCZO und andere (28) seit 1935 die Diamidine und ihre Derivate als trypanocide Substanzen in der Meinung , diese veränderten durch ihre blutzuckersenkende Wirkung das Milieu für die Trypanosomen ungünstig . Dagegen konnten LOURIE und YORKE 1937 (35) zeigen , daß Diamidin-derivate auch bei Konzentrationen , die den Blutzucker nicht beeinflussen , trypanocid wirken . In England wurden die Diamidine wegen ihrer antiseptischen Wirkung während des Krieges 1939 - 1945 in der Wundbehandlung verwendet . Nachdem die Dia -

midine auch von SNAPPER (45) bei Leishmania - Erkrankungen (Kala Azar) und Trypanosomainfektionen , die wie die Plasmacytome Hyperproteinämie zeigen , erfolgreich angewendet worden waren , führte er sie 1946 zur Behandlung von Plasmacytomen ein . SNAPPER konnte unter Stilbamidintherapie beim Plasmacytom eine subjektive Besserung , vor allem hinsichtlich der Schmerzen, erzielen , indem die osteoplastische Proliferation der Myelomzellen vorübergehend aufgehoben wurde . Er forderte allerdings eine eiweißarme Diät , deren Wert von PROPP (37) , HORSTER und SANDKÜHLER (24) bestritten wurde .

In den Knochenmarkpunktaten waren weiterhin reichlich Myelomzellen vorhanden . Auffällig war aber das Auftreten von basophilen Granula im Cytoplasma (SNAPPERS inclusion bodies) , die nur bei Patienten mit Bence-Jonesschen Eiweißkörpern im Urin oder mit Erhöhung der Plasmaglobuline vorkamen (47 ; 46).

HEILMEYER , MERK und PIRWITZ (23) , Tomek (49) und WENZEL (55) stellten unter Stilbamidintherapie eine vorübergehende Besserung der osteoplastischen Proliferation , Abnahme der Myelomzellen und einen Rückgang des Serumeiweißgehaltes fest. Über eine Linderung der Schmerzen nach Anwendung von Stilbamidin berichteten FLEISCHHACKER (15), JAEGER (26),

HORSTER und SANDKÜHLER (24) sowie SCHULTEN und PRIBILLA (44) . GUNZ (21) erreichte bei der Behandlung der Retikulosen mit Stilbamidin eine subjektive Besserung . Neuerdings konnten von IVADY , PALDY und UNGER (25) statistisch signifikante Heilungen plasmacellulärer Pneumonien bei Säuglingen erzielt werden.

Als Nebenwirkung der Stilbamide treten Nieren - schäden und Paraesthesien , vor allem des Trigemini', ferner Herabsetzung des Blutdrucks und Appetitlosigkeit auf. Wie alle Cytostatica scheinen sie auch cancerogen zu wirken (24).

Gegenüber den anderen bei Plasmocytom angewendeten Cytostatica , wie Urethan , Pentamidin ,Chlorambucil in Verbindung mit Corticosteroiden ,Endoxan und den Antimetaboliten besitzt Stilbamidin die größte therapeutische Breite.

Cytologisch wies KOPAC 1947 (31) in Gewebekulturen von Tiertumoren nach Diamidinverabfolgung die Aufhebung von Mitosen in den Geschwulstzellen und die Zerstörung dieser Zellen nach. Er machte für diese Vorgänge die Hemmung der Aminoxydase verantwortlich und erklärte die Kernveränderungen als Reaktion des Stilbamidins mit den spezifischen Nucleoproteiden .Auf Myelomzellen war die Wirkung nicht so groß wie auf die Tumorzellen ; normale Zellen wurden überhaupt nicht beeinflusst.

SNAPPER und SCHNEID (47) zeigten 1948 ,daß Stilbamidin sich mit den in den Plasmocytomzellen gebildeten Ribonukleinsäuren zu basophilen Präzipitaten verbindet , den SNAPPER -SCHNEID'SCHEN Einschlüssen oder inclusion bodies . SNAPPERS Meinung nach hemmen Arginin und Nukleinsäuren Stilbamidin in dieser Wirkung . GEMMIL (17) wies eine Störung der Glykolyse durch Stilbamidin nach . BICHOWSKI (5) stellte fest , daß die hemmende Wirkung der Diamidine auf die Fermenttätigkeit von Bakterien durch Polyamine aufgehoben werden kann . SCHMITZ (41) kam nach Untersuchungen über eine Parallele in der Wirkung der Stilbylamine auf Zellstoffwechsel und Zellteilung von Mäuseascitestumorzellen zu dem Schluß , daß nur der Zellstoffwechsel beeinflußt wird . Nach LETTRE (33) und DRUCKREY (12) besitzen zweiwertige Phenole eine zellteilungshemmende Wirkung auf Fibroblasten , Mäuse - und Rattentumorzellen .

Beim Plasmocytom sind die Plasmazellen stark vermehrt und morphologisch verändert .

Im Knochenmark sind normalerweise 1-2 % Plasmazellen - berechnet auf die Zellen der Granulopoese - vorhanden (38). Die Plasmazellen wurden zuerst von WALDEYER und UNNA (53) beschrieben . Ihre

Herkunft ist noch umstritten :

APITZ , OSGOOD und ASHWORTH (38) leiten die Plasmazellen von Myeloblasten ab . Eine histiocytäre Abstammung befürworten LAMBIN und DE WEERDT (38) . Für eine lymphatische Genese treten PINEY , ALBERTINI und KLIMA (38) ein . ROHR , SCHULTEN , NOR-
DENSON , HEILMEYER u.a. (38) vertreten die Auffassung von retikulärer Abstammung , wie sie schon von FERRATA und SABRAZES (38) angenommen wurde . Dabei lassen sie die Frage offen , ob die Plasmazellen innerhalb des Retikulo - Histiocytären Systems (R. H.S.) eine selbständige Stellung einnehmen oder ob sie aus den Retikulum - und Adventitiazellen gebildet werden . UNDRITZ , KEILHACK und LINK , FLEISCHHACKER , BRASS und DI GUGLIEMO (38) sind der Meinung , daß die Plasmazellen aus den unabhängigen Plasmoblasten über die Zwischenstufe der Proplasmocyten entstehen . Für die Bildung der Plasmazellen sowohl aus lymphatischen als auch aus Retikulumzellen sprechen sich HITTMAIR , MOESCHLIN und DUBOIS-FERRIERE (38) aus . Nach den letzten Untersuchungen von BRAUNSTEINER , FELLINGER und PAKESCH (11) entstehen die Plasmazellen aus den lymphoiden Retikulumzellen durch Ausreifung . Sie stellten elektronenmikroskopisch fest , daß unter Antigeneinwirkung in den lymphatischen Retikulum -

zellen ein Ergastoplasma gebildet wird . Auch in den vorliegenden Fällen weist das vermehrte Vorkommen von Übergangsformen auf diese Abstammung hin .

Funktion der Plasmazellen : Bei malignen Systemerkrankungen , chronischen Infektionskrankheiten und Allergisierung kann man eine Vermehrung der Plasmazellen im Knochenmark und in der Milz nachweisen. Unter Antigeneinwirkung tritt mit der Vermehrung der γ - Globuline im Serum als Ausdruck der Antikörperbildung eine Zunahme der Plasmazellen auf : Die Plasmazellen sind eiweißsezernierende Zellen (51 ; 56) . Dabei ist die Art der Sekretion noch offen . Sie steht aber sicher mit dem Ergastoplasma in Verbindung . Die sezernierten Proteine sind normalerweise γ - Globuline , pathologisch Paraproteine .

STOBBE (48) unterteilt die Entwicklungsstufen der Plasmazellen in unreife - Plasmoblasten - und reife Plasmazellen .

Die Plasmoblasten sind 20μ - 25μ groß und haben einen runden , meist zentral gelegenen Kern . Er ist locker und verschwommen strukturiert und enthält mehrere Nucleoli (1-3) . Das Cytoplasma ist bei der Pappenheimfärbung zartblau und bildet nur einen schmalen Saum . Granula sind im Plasma nicht vorhanden . Im späteren Stadium bildet sich an einer Seite des Kernes ein heller Hof , das Archoplasma , und es entstehen kleine Vakuolen . Die Mikrostruktur - elek-

tronenoptisch nachweisbar - besteht aus dem im Archoplasma vorhandenen Golgiapparat , dem Diplosom oder Zentralkörperchen und dem für die Eiweißsekretion wichtigen Ergastoplasma . In der Peripherie der Zelle liegen die Mitochondrien , die nur mit dem Phasenkontrastverfahren beobachtet werden können und als kleine schwarze Stäbchen und Punkte auffallen . Sie sind bei den Plasmoblasten infolge der gesteigerten Antikörperproduktion besonders groß und zahlreich vorhanden . Außerdem treten im peripheren Plasma noch lipoidhaltige Glanzkörper auf .

Die reifen Plasmazellen haben eine gestreckte Zellform und sind kleiner als die unreifen . Ihre Größe beträgt 15 μ - 20 μ . Der Kern liegt exzentrisch , ist dunkel und relativ klein . Die Kernstruktur ist grobbalkig und zeigt "Radspeichenform " . Nucleoli sind nicht zu erkennen . Bei der panoptischen Färbung ist das Plasma tiefblau , besitzt damit eine große Ribonukleinsäurekonzentration und enthält ein breites Archoplasma , das im Unterschied zu den Osteoklasten dem Kern dicht anliegt . Am Rand befinden sich oft kleinere oder größere optisch leere Vakuolen . Ferner kann das Plasma nadelförmige , azurophile Einschlüsse , die an die Auerstäbchen der neutrophilen Promyelocyten erinnern , und kugelige oder polyedrische Ablagerungen , die Ausdruck einer gesteigerten Sekretionsleistung sind (Russelkörperchen

bzw. Mott'sche Einschlüsse) , enthalten . Zwei- und Mehrkernigkeit kommen vor .

Die Plasmazellen sind weitgehend fixe Gewebszellen . Ihre Erkrankungen manifestieren sich nur äußerst selten als Leukämien durch Ausschwemmung ins Blut, meist wachsen sie wie echte maligne Tumoren kontinuierlich. Sie verdrängen dabei die myelopoetischen Zellen , die durch die physiologische Auswanderung laufend vermindert werden (38;48).

Morphologie der Plasmacytomzellen :

nach SCHULTEN , WALLGREEN und ZADEK (57) sind die Plasmacytomzellen neoplastisch entdifferenzierte Plasmazellen . Sie zeigen - besonders hinsichtlich der Zell - und Kerngröße - eine starke Polymorphie. Zwischen den Zellgrößen und der Art der Eiweißsekretion und damit der Art der Plasmacytome ist keine Beziehung nachzuweisen (38 ; 54) . Es konnte aber festgestellt werden , daß die Zellen der α -Plasmacytome am unreifsten , die Zellen der γ -Plasmacytome am reifsten sind. (38).

Die Zellform der Plasmacytomzellen ist austernschalenartig oder oval , häufig ist die Plasmabegrenzung unscharf . Die Kerne sind meistens rund und haben besonders große Nucleoli. Die Kernstruktur ist körnig oder grobschollig , verwaschen und unregelmäßig. Es besteht eine Diskrepanz zwischen Kern - und Plasma

reifung , indem der Kern seinen unreifen Charakter behält . Die Kernplasmarelation ist zugunsten des Kernes verschoben . Das Plasma ist wolzig-wabig, hell- bis dunkelblau bei der Pappenheimfärbung . Das Archoplasma fehlt meistens . Vakuolen können gegen - über den Verhältnissen in normalen Plasmazellen als Folge der gesteigerten Eiweißproduktion vermehrt auftreten . Azurophile Einschlüsse , Mott'sche - und Russelkörperchen können ebenfalls vermehrt vorkommen . Zwei - und Mehrkernigkeit können zunehmen. Im Gegensatz zu FIESCHI und SACCHETTI (14), die die mehrkernigen Zellen auf eine direkte Kernteilung zurückführen, hält UNDRITZ (50) eine amitotische Zellvermehrung bei Plasmazellen wie bei anderen Knochenmarkzellen nicht für möglich . Nach Beobachtungen in vitro fließt die Zellsubstanz beider Tochterzellen nach vollendeter mitotischer Teilung wieder zusammen , wodurch zweikernige Zellen entstehen(7).

In dieser Arbeit soll die Frage untersucht werden , ob Stilbamidin direkt auf die pathologisch veränderten und vermehrten Plasmazellen wirkt . Eine direkte Zellbeeinflussung unter Ausschluß nervöser und humoraler Komponenten ist nur in vitro möglich. Außerdem entfällt in der Kultur die Zellausschwemmung , so daß zur Beurteilung der Differenzierung günstigere Verhältnisse als in vivo vorliegen . Deshalb soll hier die direkte Beeinflussung der Morphologie der Plasmacytomzellen durch Stilbamidin an der Kultur getestet werden .

Bei der Sternalpunktion Plasmacytomkranker gewinnt man das autonom wuchernde Gewebe . Die Plasmazellen bestimmen fast allein das Bild . Es wurden von dem durch Sternalpunktion gewonnenen Knochenmarksgewebe Kulturen ohne Zusatz und Kulturen mit Zusatz von Stilbamidin angelegt , um am jeweils entsprechenden Untersuchungsmaterial Vergleiche anstellen zu können.

Methode

Nach ALBRECHT und BOLL (1) wurde unter Anlehnung an die Carrel'sche Technik eine Gewebezüchtung im hängenden Koagulum durchgeführt .

Das Nährmedium besteht aus Patientenserum , Hühnerplasma und Hühnerembryonalextrakt sowie aus Ringerlösung für die Kontrolle , der für die Versuchskul-

turen Stilbamidin zugesetzt wird , so daß eine Endkonzentration von 0,03 mg% ; 0,3 mg% und 3,0 mg% (die Tagesdosis von 150 mg auf 5 l Blut umgerechnet sind 3 mg%) entsteht . Nach Koagulation des Nährmediums auf Objektträgern gibt man ein Knochenmarkbröckchen darauf und überschichtet es mit dem Serum des jeweiligen Patienten , das Stilbamidin in gleicher Konzentration wie das Nährmedium enthält . Die Kulturen werden mit hohlgeschliffenen Objektträgern luftdicht verschlossen und umgewendet , so daß ein hängender Tropfen entsteht . Die Bebrütung wird bei 37°C im Wärmeschrank vorgenommen . Nach 24 bzw. 27 Stunden und nach 48 Stunden werden die Kulturen aufgebrochen , ausgestrichen und nach Pappenheim gefärbt.

Zur einwandfreien Differenzierung der Zelltypen wurden Gebiete mit aufgelockertem Zellgehalt ausgezählt.

Die Plasmocytomzellen wurden wegen des unreifen Charakters aller Zellen nach Kerngröße und -struktur sowie nach Cytoplasmamorphologie , -farbe und der Cytoplasmamenge unterschieden . Es ergab sich folgende Differenzierung :

Typ 1 : Kerndurchmesser $12\mu - 14\mu$	Plasma: zartblau , wabig Kern : feinkörnig, locker , mit mehreren Nucleoli
Typ 2 : Kerndurchmesser $10\mu - 11\mu$	

Typ 3 : Kerndurchmesser $7\mu - 9\mu$: Plasma: dunkelblau,
dicht

Kern: grobschollig,
dicht

Typ 4 : Kerndurchmesser $4\mu - 6\mu$: Plasma : dunkelblau,
dicht

Kern: grobschollig ,
dichter und dunk-
ler als der des
Typs 3

Bei jedem Typ wurde im Hinblick auf die unterschied -
liche Cytoplasmamenge noch eine Unterteilung in Typ
a und b vorgenommen :

Typ a : es dominiert wie bei den normalen Plasmazel-
len das Plasma , der Kern ist jedoch viel unreifer .

Typ b : das Plasma bildet nur einen schmalen Saum ,
die Kernplasmarelation ist zugunsten des Kernes ver-
schoben .

Die Abb. 1 zeigt Mikrofotogramme der Typen 1a bis
4b.

Zur Einordnung der Mitosephasen wurde die Unterschei-
dung nach BOLL (7) zugrundegelegt und der Ablauf in
6 Phasen unterteilt :

Prophase

frühe Metaphase

späte Metaphase

Anaphase

Telophase

Rekonstruktionsphase

In der Prophase hat sich die Kernmembran aufgelöst, die Nucleoli sind verschwunden . Die Chromosomen ,die als dünne Fäden sichtbar werden , bilden ein festes Spirem .

Anschließend in der frühen Metaphase lockert sich das Spirem auf , die Chromosomen liegen ungeordnet im Teilungsraum .

In der späten Metaphase haben sich die Chromosomen in der Äquatorialplatte zusammengelagert und bilden bei Aufsicht einen Monaster .

Zur Zeit der darauf folgenden Anaphase sind die Chromosomen in zwei Gruppen im Raum verteilt und ergeben das Bild eines Diasters .

In der Telophase beginnt sich der Zelleib durchzuteilen , die Chromosomen bilden in beiden neuen Kernen ein lockeres Spirem (Di-Spirem).

Während der sich anschließenden Rekonstruktionsphase lagern sich die Chromosomen zu einem festen Di - Spirem zusammen . Nucleoli und Kernmembran fehlen noch. Die beiden Tochterzellen sind meistens noch durch einen feinen Plasmafaden miteinander verbunden .

In den Ausstrichpräparaten wurden jeweils 200 Plasmocytomzellen differenziert und die Kerndurchmesser mit dem Okularmikrometer gemessen ; für jede Kulturzeit wurden 2 Ausstriche pro Konzentration ausgezählt .

Bei zwei Patienten war es möglich , in den Original-

und Kulturausstrichen den Prozentsatz der Plasmocytomzellen - berechnet auf die Zellanzahl der Granulopoese festzustellen . In den anderen Fällen traten neben den Plasmocytomzellen nur so vereinzelt Zellen der Granulo- und Erythropoese auf , daß keine Verhältniszahlen angegeben werden konnten .

Der Mitoseindex , der die Anzahl der Mitosen auf 1000 teilungsfähige Zellen angibt , konnte nur in den Originalpräparaten ermittelt werden , da in den Kulturen keine Mitosen aufgefunden wurden . Der Mitoseindex in den Originalpräparaten wurde , da infolge des unreifen Charakters aller Plasmocytomzellen nicht zwischen teilungsfähigen und nicht mehr teilungsfähigen Zellen unterschieden werden konnte , auf die Gesamtheit der Plasmocytomzellen , mit Ausnahme der Zellen mit pyknotischem Kern , berechnet . Es wurden je Original - präparat zu diesem Zweck 1000 Plasmocytomzellen ausgezählt . Die Summe der gezählten und ausgemessenen Plasmocytomzellen betrug 13 000 , die Gesamtzahl aller gezählten Zellen betrug 27 000 .

Mit der Auszählung der Plasmocytomzellen wurde nur die relative Zusammensetzung der Formvarianten innerhalb der Plasmocytomzellen und ihre Änderung während der Kulturzeit von 2 Tagen mit und ohne Stilbamidinzusatz erfaßt.

Die Ergebnisse wurden graphisch dargestellt und fotografiert und die Veränderungen der Stilbamidinkulturen gegenüber den Kontrollkulturen sowie die Unterschiede zwischen den Kulturausstrichen ohne Zusatz und

den Originalausstrichen berechnet .

Die erste Versuchsreihe wurde mit dem Sternalmark eines 45 - jährigen Patienten (K.L.) mit einem γ -Plasmocytom durchgeführt . Zur Zeit der Punktion zeigte das Blut - bild eine normochrome Anämie . Im peripheren Blut waren keine Plasmazellen aufgetreten .

Im Originalausstrich der Sternalpunktion sind die Plasmazellen auf 38% - berechnet auf die Gesamtheit der Zellen der Granulopoese - vermehrt .

Die Zellform der pathologischen Plasmazellen ist rund, oval oder austerschalenartig .

Bei den vorhandenen Zellen besteht eine Diskrepanz zwischen Kern - und Cytoplasmareifung , die Kerne bleiben unreif . Die Kernplasmarelation ist zugunsten des Kernes verschoben . Bei der Differenzierung nach den Kern - und Cytoplasmamerkmalen ergibt sich folgende Verteilung (Abb. 2) :

Typ 1a : 2% Typ 1b : 2%

Typ 2a : 44% Typ 2b : 5%

Typ 3a : 38% Typ 3b : 5%

Typ 4a + 4% Typ 4b : -

Pyknose (1%)(Abb. 3) und Zweikernigkeit treten nur vereinzelt auf .

Im Plasma finden sich feine azurophile Granula und vermehrt Vakuolen .

Der Mitoseindex beträgt im Originalausstrich 1 %.

In den Kulturen ohne Zusatz zeigt sich zeitabhängig eine Verringerung der Plasmocytomzellen gegenüber den Zellen der Granulopoese (Tabelle 1).

Es ist gegenüber dem Original eine Verschiebung in dem prozentualen Anteil der einzelnen Zelltypen festzustellen. Die Zellen mit kleinerem Kern (Typ 3 und 4) nehmen zu, die Zellen mit größerem Kerndurchmesser (Typ 1 und 2) ab . In den 48 - Stunden - Präparaten nimmt die Anzahl der Zellen des Typs 2 wieder etwas zu (Abb.2).

Die Zellen mit pyknotischem Kern treten vermehrt auf (Abb. 3) . Zweikernigkeit ist unregelmäßig und nicht stärker vorhanden .

Das Plasma ist homogener als das der Zellen im Originalausstrich , es enthält nur wenig Vakuolen . Die Zellmembranen sind häufig zerstört , besonders nach 48 Stunden .

In den Stilbamidinkulturausstrichen verringern sich zeitabhängig die Plasmocytomzellen gegenüber den Kulturen ohne Zusatz . Die Verschiebung in dem Vorkommen der einzelnen Zelltypen nimmt zeitabhängig zugunsten der Zellen mit kleinerem Kern zu . Nach 48 Stunden vermindern sich die Zellen des Typs 4 wieder etwas zugunsten des Zelltyps 3 . Die 3b- Zellen nehmen zahlenmäßig ab (Abb. 2) . Innerhalb der einzelnen Stilbamidinkonzentrationen kann keine dosisabhängige Wirkung festgestellt werden (Abb. 2) . Die Zellen sind bei der Konzentration 3,0 mg% Stilbamidin besser erhalten als bei dem ~~nix~~ Stilbamidinzusatz von 0,3mg%.

Die Zahl der Zellen mit pyknotischem Kern ist gegenüber den Kulturausstrichen ohne Zusatz vermehrt (Abb.3).

Mehrkernigkeit und Vakuolen im Plasma treten in den einzelnen Ausstrichen und Zellen unregelmäßig und nicht besonders häufig auf.

Das Cytoplasma ist in den 24 - Stunden - Präparaten homogen , nach 48 Stunden grobblasig , graurötlich und enthält häufig Russelkörperchen . Es treten im Cyto - plasma der Zellen der Stilbamidinkulturen basophile Granula (inclusion bodies) auf , sie werden mit zunehmender Dosis und Kulturzeit gröber und nehmen an Zahl zu , entsprechend nimmt auch die Zahl der Zellen mit basophiler Granulation zu (Abb,5).

Mitosen sind in den Kulturausstrichen nicht gefunden worden .

Tabelle 1

Originalausstrich: 38% Plasmocytomzellen-
bezogen auf die Zellzahl
der Granulopoese -.

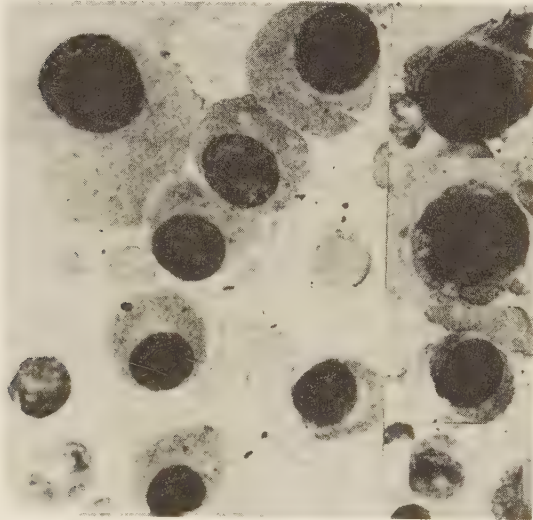
<u>Kultur</u>	<u>Plasmocytomzellen</u>	
	<u>nach 24 h</u>	<u>nach 48 h</u>
ohne Zusatz	10,0 %	5,0 %
Stilbamidinzusatz 0,03 mg%	7,0 %	4,2 %
Stilbamidinzusatz 0,5 mg%	6,8 %	4,3 %
Stilbamidinzusatz 3,0 mg%	6,2 %	3,8 %

Abbildung 1 :

Plasmacytomzellen Typ 1-4

Das Cytoplasma der Zellen des Typs a enthält z.T.
dunkles Pigment (inclusion bodies - Stilbamidin -
präzipitate -)

Typ 1a 2x Typ 3a Typ 2a



Typ 1b

Typ 2b

Typ 3b

Typ 4b

1 stab-
förmiger

Typ 4a

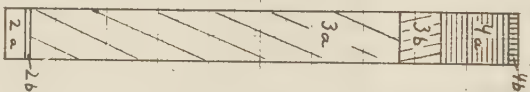
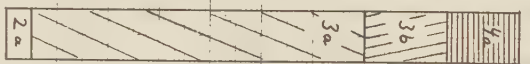
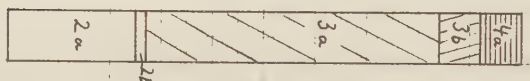
Granulocyt zum
Größenvergleich

In Abbildung 2 ist die prozentuale Verteilung der Zelltypen 1-4 innerhalb der Versuchsreihe K.L. dargestellt .

Die Abbildung 3 zeigt die Anzahl der Zellen mit pyknotischem Kern in den Versuchsreihen K.L., L.P., A.E. III und A.E. v. in Prozenten.

Abbildung 4 : Fotos der Zellen mit inclusion bodies

Die Abbildung 5 zeigt die Anzahl der Zellen mit inclusion bodies in den Versuchsreihen K.L., L.P. , A.E. III und A.E.V in Prozenten .



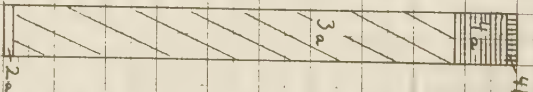
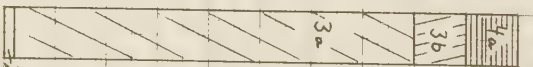
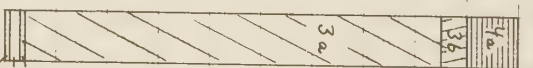
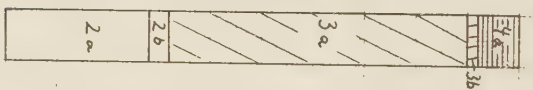
ORIGINAL

KULTUREN NACH 24 STUNDEN

ABB. 2

OHNE
ZUSATZ

MIT STILBARIOLINZUSATZ
0,03 mg% 0,3 mg% 3,0 mg%



KULTUREN NACH 48 STUNDEN

OHNE
ZUSATZ

MIT STILBARIOLINZUSATZ
0,03 mg% 0,3 mg% 3,0 mg%

VERSUCHSREIHEN K.L., L.P., A.E.M., A.E.V.

ANZAHL DER ZELLEN MIT PYKNOTISCHEM KERN

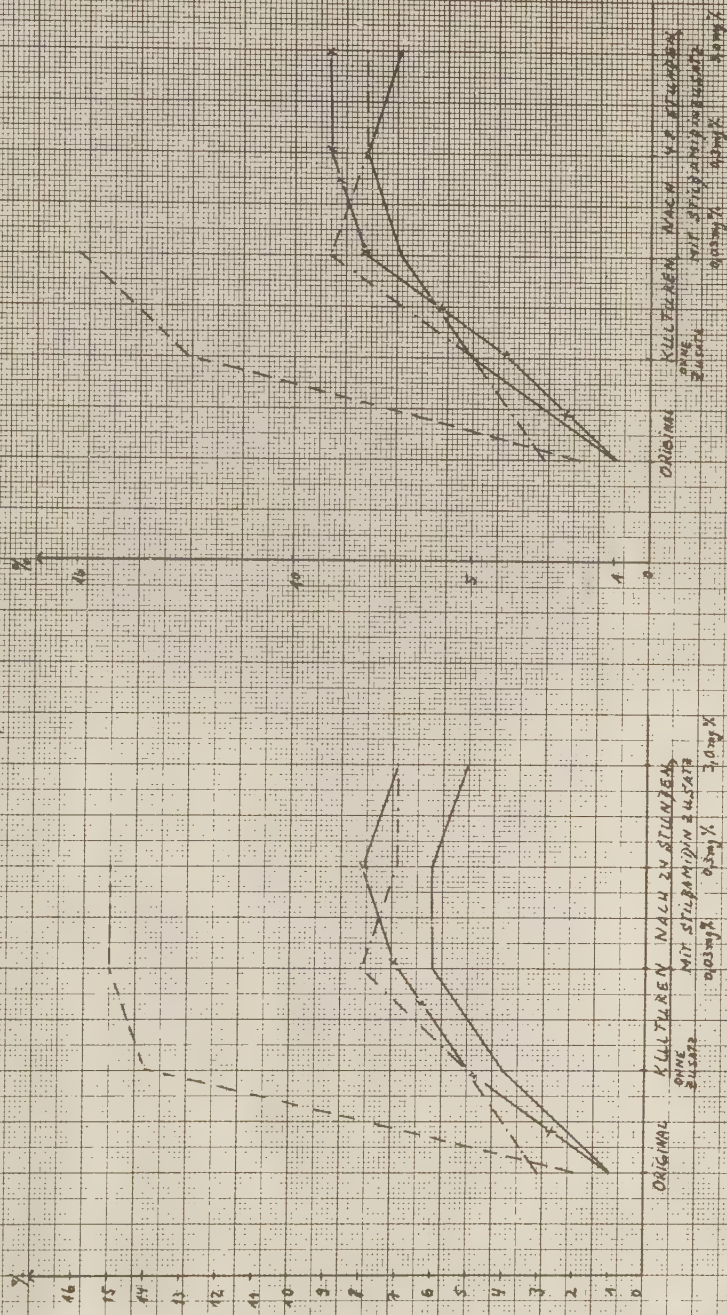


Abb. 3 K.L. L.P. A.E.M. A.E.V.

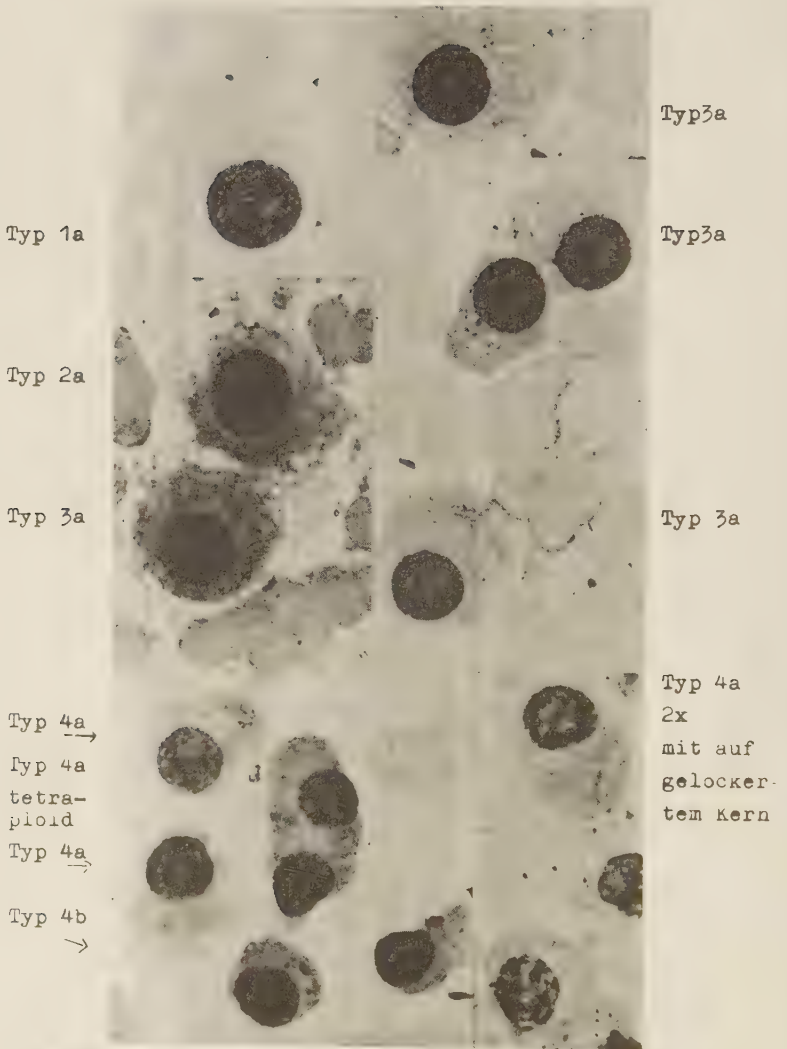
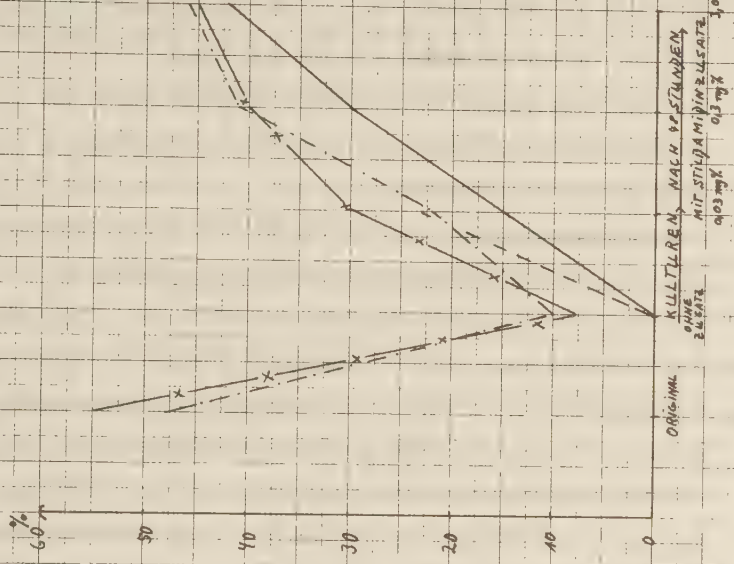
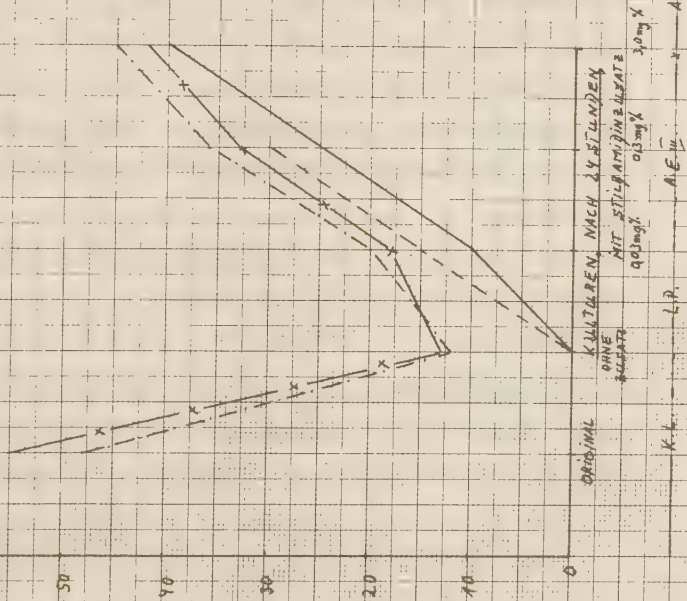


Abb. 4 Plasmacytomzellen mit inclusion bodies im
Cytoplasma

VERTEILUNGSGEHEIN K.L., L.P., A.E.M., A.E.V.

ANZAHL DER ZELLEN MIT INCLUSION BODIES

60%
50
40
30
20
10
0



Die zweite Versuchsreihe wurde mit Sternalmark einer 28 - jährigen Patientin (L.P.) mit chronischer Cystopyelitis und beginnendem Plasmocytom angesetzt.

Das Blutbild zeigte zur Zeit der Punktion eine verminderte und nach links verschobene Erythropoese , eine hypochrome Anämie .

Die Sternalpunktion ergibt eine Vermehrung der Plasma - und großen, lymphoiden Retikulumzellen auf 24 % - berechnet auf die Zellzahl der Granulopoese -.

Die vorgefundenen Plasmazellen sind fast alle austernschalenförmig und zeigen die Atypien der Plasmocytomzellen : Es besteht eine Diskrepanz zwischen Kern - und Plasmareifung und die Kernplasmarelation ist zugunsten des Kernes verschoben . Die Kerne differieren sehr stark in der Größe . Es sind vorhanden (Abb.6):

Typ 1a : 1% Typ 1b : 1%

Typ 2a : 16% Typ 2b : 8%

Typ 3a : 64% Typ 3b : 10%

Vereinzelte kommen pyknotische Kerne (2%)(Abb. 3) vor. Mehrkernigkeit tritt unregelmäßig und nur geringfügig auf .

Das Cytoplasma ist verschwommen retikulär , vakuolisiert und enthält azurophile Granula .

Der Mitoseindex des Originalausstriches beträgt 20%o.

Es kommen vorwiegend Pro - und frühe Metaphasen vor.

In den Kulturen ohne Zusatz nimmt zeitabhängig die Zahl der Plasmocytomzellen gegenüber dem Original ab (Tab. 2) .

Die prozentuale Verteilung der einzelnen Zelltypen

ändert sich zugunsten der Zelltypen 3 und 4 . Nach 48 Stunden nimmt die Zahl der Zelltypen 2 und 3 ab, die Zahl der Typen 1 (nur geringfügig) und 4 zu (Abb. 6).

Die pyknotischen Kerne kommen vermehrt vor (Abb.3).

Das homogene Plasma enthält unregelmäßig und nicht vermehrt Vakuolen und feine azurophile Granula . Die häufige Zerstörung der Zellmembranen nimmt mit der Zeit zu . Russelkörperchen kommen vorwiegend nach 48 Stunden vor .

Mitosen sind nicht vorhanden .

In den Stilbamidinkulturen nimmt die Zahl der Plasmocytomzellen zeitabhängig ab (Tab. 2) , und der Anteil der einzelnen Zelltypen verschiebt sich zugunsten der kleineren Zellkerne (Typ 3 und 4) :

Nach 24 Stunden nehmen die Zellen des Typs 2 ab , der Typ 4 nimmt zu . Nach 48 Stunden sind die Zellen des Typs 2 stark vermindert , die Anzahl der Typen 3 und 4 nimmt zu . Dabei nimmt Typ 3b ab (Abb. 6).

Die Ausstriche der Stilbamidinkulturen mit 0,3 mg% nach 48 Stunden und 3,0mg% nach 24 und 48 Stunden konnten nicht ausgezählt werden , weil der Anteil der zerstörten Zellen zu groß war .

Die Zahl der pyknotischen Kerne nimmt zeitunabhängig zu (Abb. 3) .

Zweikernigkeit und Vakuolen treten in den Ausstrichen unregelmäßig und nicht vermehrt auf .

Das Plasma ist zum größten Teil unscharf begrenzt und enthält feine azurophile und basophile Granula (in-

clusion bodies) . Die letzteren nehmen mit der Zeit und mit steigender Dosis zu , entsprechend vermehrt sich die Zellzahl mit basophilen Granula (Abb. 5). Auch in den zerstörten Zellen der hier nicht dargestellten Konzentrationen sind sie reichlich und grobkörnig vorhanden.

In den 48 - Stunden - Präparaten finden sich wie in den Kontrollausstrichen Russelkörperchen .

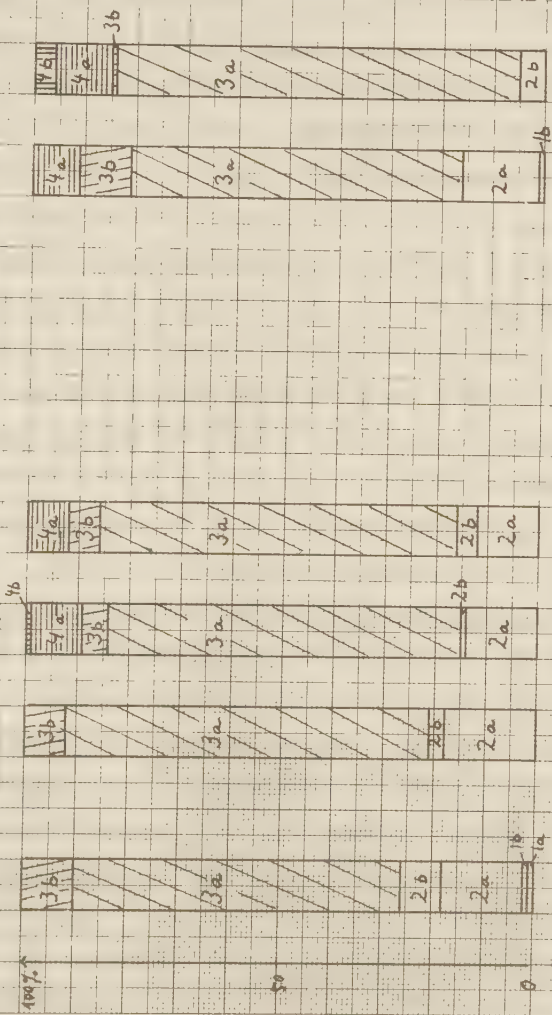
Mitosen sind nicht vorhanden.

Tabelle 2

Originalausstrich : 24 % Plasmocytomzellen -
berechnet auf die Zell-
zahl der Granulopoese

<u>Kultur</u>	<u>Plasmocytomzellen</u>	
	<u>nach 24 Stunden</u>	<u>nach 48 h</u>
ohne Zusatz	8,0%	4,7%
Stilbamidinzusatz 0,03mg%	6,0%	4,3%
Stilbamidinzusatz 0,3 mg%	5,9%	-
Stilbamidinzusatz 3,0 mg%	-	-

In der Abbildung 6 wird die prozentuale Verteilung der Zelltypen 1 - 4 innerhalb der Versuchsreihe dargestellt.



KULTUREN NACH 48 STUNDEN
OHNE ZUSATZ 0,034%
MIT STILBAMIDIN 0,034%

KULTUREN NACH 24 STUNDEN
OHNE ZUSATZ 0,034%
MIT STILBAMIDIN 0,034%

Bei der dritten Versuchsreihe wurde Sternalmark eines 57-jährigen Patienten (A.E.) mit stark fortgeschrittenem γ -Plasmocytom und nach Stilbamidinbehandlung verwendet (Sternalpunktion III).

In dem Originalausstrich findet man fast ausschließlich Plasmocytomzellen .

Die Zellform ist rund , oval oder austernschalenartig. Es besteht eine Diskrepanz zwischen Kern - und Plasma-reifung und die Kernplasmarelation ist zugunsten des Kernes verschoben . Es sind vorhanden (Abb.7) :

Typ 1a : 5%	Typ 1b : -
Typ 2a : 61%	Typ 2b : 3%
Typ 3a : 28%	Typ 3b : 3%

Pyknose (3%) (Abb.3) und Zweikernigkeit treten nur vereinzelt auf .

Das Plasma ist verschwommen retikulär und enthält feine azurophile und ⁱⁿ48 % grobe basophile Granula (inclusion bodies) (Abb. 4 und 5) . Vakuolen kommen geringfügig vor .

Der Mitoseindex beträgt 5 ‰ . Es sind vorwiegend Pro- und frühe Metaphasen vorhanden .

In den Kulturen ohne Zusatz ist die Zelldichte sowohl nach 27 als auch nach 48 Stunden sehr stark vermindert. Es sind viel Detritus und Russelkörperchen vorhanden. Der prozentuale Anteil der Zellen mit größerem Kern (Typ 1 und 2) nimmt zugunsten des Zelltyps 3 stark ab . Nach 48 Stunden kommt der Zelltyp 4 vereinzelt vor , die Zahl der Typen 2 und 3 bleibt fast gleich .

Die 3b - Typen nehmen allerdings stark ab (Abb. 7).

Das Plasma enthält vereinzelt Vakuolen und ebenso grobe und nicht vermehrt basophile Granula (inclusion bodies) wie in den Zellen des Originalausstriches.

Die Anzahl der Zellen mit basophiler Granulation nimmt gegenüber dem Originalausstrich zeitabhängig ab. (Abb.5).

Nach 48 Stunden treten vermehrt Zellen mit aufgelöster Zellmembran auf .

Mitosen sind nicht vorhanden .

In den Stilbamidinkulturausstrichen nehmen zeitunabhängig die Zelltypen 1 und 2 zahlenmäßig ab , die Zellen des Typs 3a zu , die 3b - Zellen nehmen nach 48 Stunden etwas ab . Typ 4 nimmt nach 24 Stunden zu , nach 48 Stunden wieder etwas ab . Innerhalb der einzelnen Stilbamidinkonzentrationen läßt sich kein Unterschied in der Wirkung feststellen (Abb.7) .

Die Zahl der Zellen mit pyknotischem Kern ist zeitunabhängig vermehrt (Abb. 3).

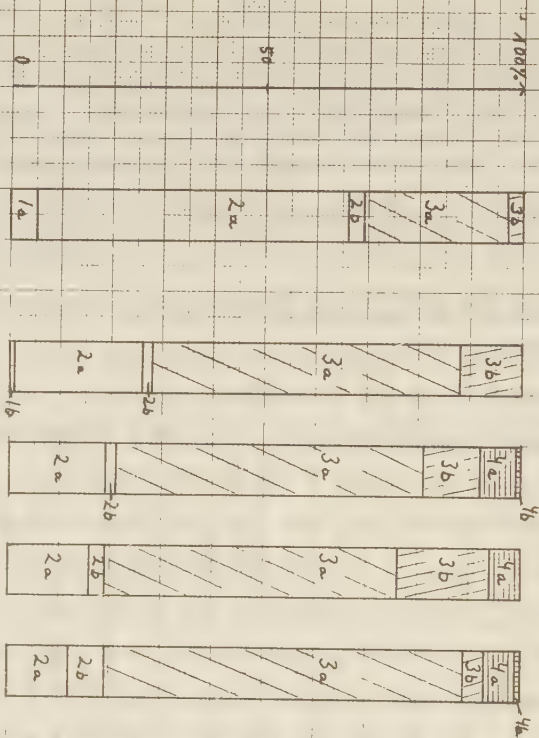
Zweikernigkeit kommt geringfügig und unregelmäßig vor .

Vakuolen im Plasma treten unregelmäßig und nicht stärker auf . Die basophilen Granula (inclusion bodies) werden mit der Zeit und mit der Dosis größer und vermehrt ; die Zellzahl mit basophiler Granulation nimmt ebenfalls mit der Dosis und auch mit zunehmender Bebrütungszeit zu bzw. weniger stark ab als in den Kulturen ohne Zusatz.

Mitosen sind nicht vorhanden.

In der Abbildung 7 wird der prozentuale Anteil der einzelnen Zelltypen 1-4 innerhalb der Versuchsreihe A.E. dargestellt.

VERSUCHSREIHE A.E. III.



APP 3

ORIGINAL

KULTUREN NACH 22 STUNDEN

KULTUREN NACH 48 STUNDEN

OHNE
ZUSATZ
MIT STILBAMPHINZUSATZ
0,03 mg/l
0,3 mg/l
3,0 mg/l

OHNE
ZUSATZ
MIT STILBAMPHINZUSATZ
0,03 mg/l
0,3 mg/l
3,0 mg/l

Für die vierte Versuchsreihe wurde Sternalmark des Patienten der dritten Versuchsreihe (A.E.) zu einem späteren Zeitpunkt und nach weiterer Stilbamidinbehandlung verwendet (Sternalpunktion V).

Der klinische Befund hatte sich verschlechtert.

Im Originalausstrich finden sich eine flächenhafte Besiedlung mit Plasmocytomzellen und viele nackte Kerne . Die Zellform ist rund, oval oder austernschalenartig . Es besteht eine Diskrepanz zwischen Kern - und Plasmareifung , die Kernplasmarelation ist zugunsten des Kernes verschoben . Es sind vorhanden (Abb.8) :

Typ 1a : 4% Typ 1b : 2%

Typ 2a : 78% Typ 2b : 9%

Typ 3a : 6% Typ 3b : 1%

Es kommen wenig Zellen mit pyknotischem Kern (1%) (Abb. 3) und vereinzelt zweikernige Zellen vor .

Das Plasma ist verschwommen retikulär , wenig vakuolisiert und enthält feine azurophile Granula und in 55% der Zellen basophile inclusion bodies (Abb. 4 und 5) .

Der Mitoseindex beträgt 6%o . Es sind hauptsächlich Pro - und frühe Metaphasen vorhanden .

In den Kulturen ohne Zusatz ist die Zelldichte nach 24 Stunden und nach 48 Stunden gegenüber dem Original sehr stark vermindert . Detritus und Russelkörperchen kommen vor , in den 48 - Stunden- Präparaten

stärker als nach 24 Stunden Kulturzeit .

Die Zellen mit größerem Kern (Typ 1 und 2) nehmen nach 24 Stunden zugunsten der Zellen mit kleinerem Kern (Typ 3 und 4) sehr stark ab . Nach 48 Stunden nehmen die Zellen des Typs 2 wieder zu , die Zelltypen 3 und 4 entsprechend ab . Der 2b- Typ wird dabei nicht vermehrt (Abb.8).

Die Anzahl der Zellen mit pyknotischem Kern nimmt etwas zu (Abb.3) .

Das Plasma ist homogener als das der Zellen des Originals . Es enthält wie das dieser Zellen basophile Granula (inclusion bodies) in gleicher Art . Die Zahl der Zellen mit basophiler Granulation nimmt gegenüber dem Original zeitabhängig ab (Abb. 5).

Nach 48 Stunden kommen vermehrt Zellen ohne Zellmembran vor .

Mitosen sind nicht vorhanden .

In den Ausstrichen der Stilbamidinkulturen nimmt die Zahl der Zelltypen 1 und 2 nach 24 Stunden ab , Zelltyp 3 nimmt weniger als in den Kulturen ohne Zusatz , Zelltyp 4 stärker zu . Nach 48 Stunden sind die Zellen der Typen 1 und 2 weiter vermindert ; die Zahl des Zelltyps 3a vermehrt , während Zelltyp 3b und 4 verringert sind .

Innerhalb der einzelnen Stilbamidinkonzentrationen tritt keine unterschiedliche Wirkung auf (Abb.8).

Die Zahl der Zellen mit pyknotischem Kern ist gegenüber den Kulturen ohne Zusatz etwas vermehrt (Abb.3). Zweikernigkeit kommt vereinzelt und unregelmäßig vor.

Vakuolen sind im Cytoplasma nicht vermehrt vorhanden.

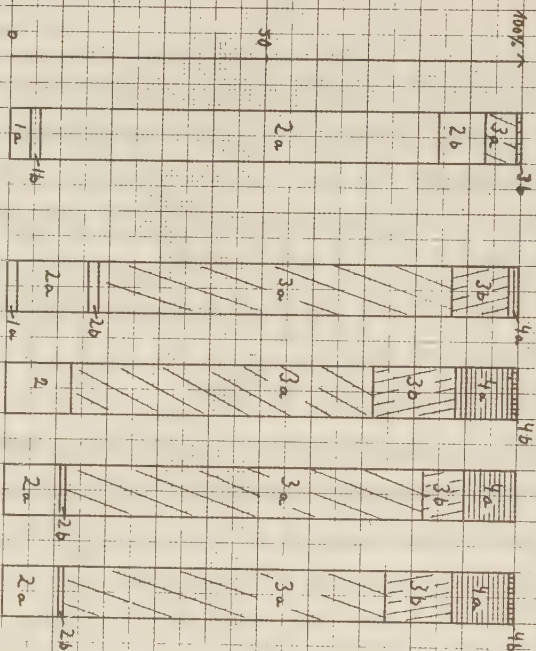
Die basophilen Granula (inclusion bodies) nehmen mit der Dosis und mit der Zeit zu und werden gröber .

Die Anzahl der Zellen mit basophiler Granulation wird ebenfalls mit der Dosis vermehrt , weniger mit der Zeit bzw. nimmt weniger stark ab als in den Kulturen ohne Zusatz (Abb. 8) .

Mitosen werden nicht gefunden .

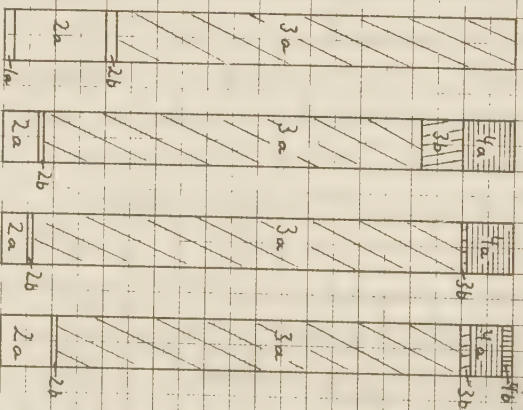
In der Abbildung 8 wird die prozentuale Verteilung der einzelnen Zelltypen innerhalb der Versuchsreihe A.E. dargestellt.

VERSUCHSREIHE A.E.V.



ORIGINAL

KULTUREN NACH 24 STUNDEN



OHNE
ZUSATZ
MIT STILBAMINZUSATZ
0,03mg% 0,3mg% 3,0mg%

KULTUREN NACH 48 STUNDEN

OHNE
ZUSATZ
MIT STILBAMINZUSATZ
0,03mg% 0,3mg% 3,0mg%

DISKUSSION

Zur Beantwortung der Frage nach dem direkten Stilb - amidineinfluß auf die pathologisch vermehrten und veränderten Plasmazellen werden Kulturen ohne Zusatz und Kulturen mit Zusatz von Stilbamidin in den Konzentrationen von 0,03 mg% , 0,3 mg% und 3,0 mg% miteinander verglichen . Da sich das Bild der Ausstriche der Kulturen ohne Zusatz gegenüber dem der Originalausstriche sehr verändert , werden auch die Zellumwandlungen in den Kulturen ohne Zusatz diskutiert . Bei der Differentialzählung der Zellen in den Ausstrichen kann nicht die absolute Zellzahl der Kultur , sondern nur die relative Zusammensetzung ermittelt werden . Es ergeben sich folgende Fragen :

Wird das Knochenmarkbild unter dem Einfluß der Kulturbedingungen , unter Stilbamidineinwirkung in vivo bzw. in vitro verändert in

1. der Zelldichte

2. der Zellmorphologie

- a) morphologische Veränderungen des Kernes
- b) morphologische Veränderungen des Cytoplasmas
- c) Änderungen im Mitosebild ?

- a) morphologische Veränderungen des Kernes können
sich zeigen
in der Kerngröße
in dem Vorkommen pyknotischer Kerne
in Vakuolisierung und Karyorhexis

in Kernversprengung

in dem Auftreten von Polyploidie bzw. Mehrkernigkeit

b) morphologische Veränderungen des Cytoplasmas las -

sen sich in der Zerstörung der Zellmembran ,

im vermehrten Vorkommen und der Nement-
stehung von Einschlüssen (Kusselkörper -
chen , Mott'sche Einschlüsse , inclusion
bodies) und

in der Vakuolisierung erkennen .

Ist bei den Veränderungen eine Abhängigkeit von der
Stilbamidinkonzentration festzustellen ?

Zu 1 - Zelldichte - :

Der Prozentsatz der Plasmocytomzellen konnte zahlen-
mäßig nur bei zwei Patienten (K.L. und L.P.) ge -
prüft werden , weil noch genügend normale Myelopoese
daneben vorkam . Die Plasmocytomzellen nehmen in den
Kultur - gegenüber den Originalausstrichen sehr stark
ab . Dabei wird dieser Vorgang unter Stilbamidinein -
fluß begünstigt . Die Abnahme der Zellzahl in den Kul-
turen ohne Zusatz ist wie in den Kulturen mit Stilb-
amidin zeitabhängig und schreitet nach 48 Stunden
fort . Die einzelnen Stilbamidinkonzentrationen zei-
gen keinen unterschiedlichen Wirkungsgrad .

Für die beiden Versuchsreihen des Patienten A.E. ist
zu bemerken , daß die Zelldichte in den Kulturen mit
und ohne Stilbamidin gegenüber den Originalausstri-
chen stark vermindert ist und die Abnahme mit der

Zeit fortzuschreiten scheint. Entgegen den Behauptungen von FIESCHI und SACCHETTI (14), die aussagen, daß die Plasmocytomzellen in der Koagulumkultur am längsten von allen Zellen ohne Entdifferenzierungszeichen überleben, muß hier festgestellt werden, daß sie schon nach 24 Stunden deutlich abnehmen. Da mit der Verminderung der Zellzahl in den Kulturen aller Versuchsreihen eine Gesetzmäßigkeit zu beobachten ist, läßt sich die Abnahme der Zellen nicht auf eine ausschließliche Ursache zurückführen, könnte aber durch die angewandte Kultivierungstechnik hervorgerufen sein.

Zu 2a - Kernmorphologie- :

Kerngröße : Die Zellen mit größerem Kernen (Kern - durchmesser $10\mu - 14\mu$) nehmen in den Kulturen ohne Zusatz nach 24 Stunden sowie verstärkt in den Kulturen mit Stilbamidinzusatz zahlenmäßig zugunsten der Zellen mit kleinerem Kernen (Kerndurchmesser $4\mu - 9\mu$) ab. In den Kulturen ohne Zusatz nehmen nach 48 Stunden die Zellen mit größerem Kernen wieder etwas zu, während in den Kulturen mit Stilbamidinzusatz die Kernverkleinerung nach 48 Stunden Kulturzeit ausgeprägter ist als nach 24 Stunden. Der Anteil der Zellen mit Kernen vom Durchmesser $10\mu - 14\mu$ geht unter Stilbamideinfluß gegenüber den Kulturen ohne Zusatz nach 24 Stunden um 37 (25-74) %, nach 48 Stunden um 64 (44-77) % zurück, die Zellzahl mit einem Kerndurchmesser von $4\mu - 9\mu$

erhöht sich nach 24 Stunden um 9 (6 - 14)% , nach 48 Stunden um 22 (13 - 42)% . Dabei nehmen innerhalb der vorherrschenden Zelltype 3 (Kerndurchmesser $7\mu - 9\mu$) die Zellen des Typs b mit wenig Cytoplasma ab . Am deutlichsten sind die Kerngrößenveränderungen unter Stilbamidineinfluß in der ersten Versuchsreihe (K.L.) . Die verschiedenen Stilbamidinkonzentrationen zeigen keinen unterschiedlichen Wirkungsgrad .

Die Kernverkleinerungen in den Kulturen mit und ohne Zusatz von Stilbamidin während der Kulturzeit von 2 Tagen lassen sich entweder mit einer gesteigerten Ausreifung oder mit einer Schrumpfung erklären . Die dabei nach 48 Stunden auftretende Abnahme des Zelltyps 3b (Kerndurchmesser $7\mu - 9\mu$), nur wenig Cytoplasma), der innerhalb der Gruppe 3 als die unreifere Form angesehen werden muß , läßt eine Reifungszunahme in Erwägung ziehen . Es muß aber beachtet werden , daß die Veränderungen der Kernstruktur schon innerhalb der ersten 24 Stunden sehr groß sind , so daß eine Verkürzung der Reifungszeit und damit der Lebensdauer in diesem Ausmaß kaum anzunehmen ist . Die Lebensdauer der Plasmocytomzellen beträgt wegen des relativ geringen Mitoseindex und der geringen DNS - Markierung (10) Wochen bis Monate . Außerdem nimmt die Zelldichte in den 48 - Stunden - Präparaten ab , so daß die Abnahme der Zellzahl des 3b - Typs auch mit der allgemeinen Zellzahlabnahme in Verbindung stehen kann. Nach 48 Stunden haben sich die Zellen mit größerem

Kern (Kerndurchmesser $10\mu - 14\mu$, Typ 1 und 2) in den Kulturen ohne Zusatz wieder etwas vermehrt , so daß eine Bremsung der Kernveränderungen , also eine Gewöhnung der Zellen an das Kulturmilieu und eine Erholung der Zellen stattgefunden haben könnte . Da jedoch zerstörte Zellmembranen und Russelkörperchen nach 48 Stunden vermehrt vorkommen und die Plasmocytomzellzahl weiter abnimmt , ist eine fortschreitende Zelldegeneration wahrscheinlicher . In den Kulturen ohne Stilbamidinzusatz nach 48 Stunden ist die weitere Kernverkleinerung gestoppt , jedoch nicht unter Stilbamideinfluß .

Kernpyknose: Die Anzahl der Zellen mit pyknotischem Kern nimmt zu (Abb. 3) . In den Kulturen ohne Zusatz vermehren sie sich nach 24 Stunden gegenüber den Originalausstrichen von 2 (1 - 3)% auf 7 (4 -14)% . Nach 48 Stunden tritt keine weitere Vermehrung auf, die Zellzahl mit pyknotischem Kern beträgt 7 (4 - 13)% . In den Kulturen mit Stilbamidin sind nach 24 Stunden 9 (6 - 15)% , nach 48 Stunden 10 (7 - 16)% Zellen mit pyknotischem Kern vorhanden . Es ergibt sich keine Abhängigkeit von der Höhe der Stilbamidinkonzentration . Mit der Zunahme nach 48 Stunden um 1 % kann bei dieser geringen Anzahl der Zellen mit pyknotischem Kern keine Abhängigkeit von der Kultivierungszeit festgestellt werden . Die unter Stilbamidin etwas vermehrte Kernpyknose kann als Degeneration durch das Kulturmilieu oder als eine mit zu-

nehmender Reifung gesteigerte Kerndegeneration angesehen werden . In der Entwicklungsreihe der Granulopoese , noch deutlicher in der der Erythropoese , tritt mit der Entwicklung zu den Segmentkernigen bzw. zu den reifen Erythroblasten Kernpyknose auf . Da die Zunahme der Plasmocytomzellen mit pyknotischem Kern sehr gering ist , spricht die schon oben erwähnte lange Lebensdauer der Plasmocytomzellen nicht gegen eine nur in so geringem Ausmaß auftretende Reifungsförderung.

karyorhexis , vakuolisierung oder eine versprengung von Kernteilen sind weder in den Original - noch in den Kulturausstrichen mit und ohne Zusatz von Stilbamin zu beobachten .

Mehrkernigkeit ist in den Original- und Kulturausstrichen mit und ohne Zusatz vereinzelt und unregelmäßig vorhanden und zeigt keine Beeinflußbarkeit durch Stilbamin .

Die Zellen der ersten beiden Versuchsreihen (K.L. und L.P.) haben im Sofortausstrich der Sternalpunktionen einen reiferen Charakter als die Zellen der Versuchsreihen des Patienten A.E. , so daß damit die in der Literatur angegebenen Befunde (38) über den reiferen Charakter der γ -Plasmocytome gegenüber den β -Plasmocytomen bestätigt werden .

Zu 2b - Cytoplasmamorphologie - :

Die Schädigung der Zellmembran nimmt in den Kulturen ohne Zusatz und verstärkt in den Kulturen mit Stilb -

amidinzusatz gegenüber den Originalausstrichen zu, besonders nach 48 Stunden Kultivierungszeit . Eine Abhängigkeit von der Stilbamidindosis ist nicht zu beobachten .

Russelkörperchen : Während in den Originalausstrichen keine Russelkörperchen vorhanden sind , treten sie in den Kulturen mit und ohne Zusatz von Stilbamidin auf . Unter Stilbamidin und mit der Zeit nehmen sie geringfügig zu . Die einzelnen Stilbamidinkonzentrationen unterscheiden sich nicht in der Wirkung .

Inclusion bodies : Mit Zusatz von Stilbamidin in den Kulturen entstehen wie nach Stilbamidinbehandlung in vivo im Cytoplasma basophile Granula (inclusion bodies), die mit der Zeit und der Dosis vermehrt und gröber werden ; die Zahl der Zellen mit basophiler Granulation nimmt ebenfalls entsprechend zu (bei K.L. und L.P.) bzw. weniger stark ab als in den Kulturen ohne Zusatz (beide Versuchsreihen des Patienten A. E.) (Abb. 5) . Bei dem mit Stilbamidin vorbehandelten Patienten (A.E.) befinden sich im Gegensatz zu den nicht mit Stilbamidin behandelten Patienten (K.L. und L.P.) in den Zellen der Original - und Kulturausstriche ohne Zusatz inclusion bodies, wie für Originalausstriche schon von SNAPPER und SCHNEID (47) beschrieben wurde. Interessant ist , daß die Zellanzahl mit basophilen Granula des Patienten A.E. , dessen Plasmacytomzellen schon in vivo mit inclusion bodies beladen wurden , in den Kulturen zurückgehen , am wenigsten bei dem höch-

sten Stilbamidinzusatz . Inwieweit die Abnahme der Zellanzahl mit inclusion bodies mit der Verringerung der Zelldichte in den Kulturen zusammenhängt , kann man mit der angewandten Technik nicht entscheiden . Da die Abnahme der Zellen mit basophiler Granulation in den Stilbamidinkulturen bei gleichbleibender Zelldichte dosisabhängig und nach 48 Stunden geringer als nach 24 Stunden ist (Abb. 5) , kann angenommen werden , daß bei diesem Patienten (A.E.) auch in vitro eine Reaktion des Stilbamidins mit der RNS stattfindet . Die Vermehrung der inclusion bodies nimmt nach 24 und 48 Stunden in allen Fällen gleichermaßen dosisabhängig zu , von durchschnittlich 5 auf 40% der Zellen . Hier konnten unseres Wissens zum ersten Mal ein Auftreten und eine Vermehrung von inclusion bodies in vitro dargestellt werden . Bisher ist ihr Vorkommen nur in vivo von SNAPPER und KOPAC (47 ; 30) beobachtet worden . Es muß sich also um eine direkte Reaktion des Stilbamidins mit der RNS des Cytoplasmas handeln .

Tabelle 3 :

Die prozentuale Anzahl der Plasmocytomzellen mit inclusion bodies im Cytoplasma :

	<u>unvorbehandelte vorbehandelte Fälle</u>							
	K.L.L.P.				A.E.			
					Sternalpunktion			
					III	V	III	V
Original	-	-	-	-	48	55	48	55
Kulturen	mg%	nach 24h	nach 48h		nach 24 h	nach 48h		
ohne Zusatz	-	-	-	-	12	13	10	8
+Stilbamidin 0,03	10	15	15	23	20	18	22	30
+Stilbamidin 0,3	25	30	30	-	36	42	41	40
+Stilbamidin 3,0	40	-	42	-	45	42	46	45

Zu 2c - Mitosebild -:

Die Proliferationsaktivität wird in der Knochenmarkkultur nach der Reifungszeit und der Teilungsfähigkeit der Zellen beurteilt . Die Mitosehäufigkeit m wird mit Hilfe des Mitoseindex (MI) und der Mitosedauer (t_m) ermittelt : $m = \frac{MI}{t_m}$. Der Mitoseindex wird als Anzahl der Mitosen auf die Gesamtheit der teilungsfähigen Zellen der jeweiligen Zellart bestimmt und in % angegeben . Der Mitoseindex für die Plasma - und Plasmocytomzellen ist sehr gering . Er beträgt nach ROHR (38) für die Plasmocytomzellen nach Untersuchung eines Falles 0,1% , nach ASTALDI (3) bei der Aufstellung des

Mitoseindexes in 10 Fällen 1,5 ‰ , nach FLIEDNER (16)
0,1 - 1 ‰ , nach BOLL (pers. Mitteilung) bei Er-
mittlung in 21 Fällen 2,3 ‰ , wobei er nach BOLL bei
rasenartiger Besiedlung des Knochenmarks erheblich
kleiner ist als bei noch gut vorhandener normaler Mye-
lopoese . Der Mitoseindex konnte in dieser Arbeit nur
für die Originalausstriche aufgestellt werden , weil
in keiner Kultur Mitosen gefunden wurden .

Da bei den vorkommenden Plasmocytomzellen nicht zwi-
schen teilungsfähigen und nicht mehr teilungsfähigen
unterschieden werden konnte , wurde der Mitoseindex
auf die Gesamtzahl der Zellen der Typen 1-4 mit Aus-
nahme der Zellen mit pyknotischem Kern , die als nicht
mehr teilungsfähig angesehen werden müssen , berech-
net. Er beträgt im Durchschnitt 8 ‰ (1-20 -5 -6‰) .
Die Mitoseindices , sowohl der des Sternalpunktions-
ausstriches einer jungen Frau im Beginn der Erkran-
kung (L.P.) als auch die der beiden Punktionsausstri-
che des Patienten A.E. mit weit fortgeschrittener, ra-
senartiger Plasmocytomzellbesiedlung und nach Stilb-
amidinbehandlung sind gegenüber denen der Literatur -
angaben als auffällig hoch anzusehen . Um so auffäl-
liger ist die Mitosesistierung in Kultur bei den be-
obachteten Fällen . Sie muß als Folge der Verkleine-
rung der Plasmocytomzellkerne angesehen werden . Aus
der Morphologie der unter Stilbamidineinfluß verklei-
nerten Zellkerne läßt sich nichts über eine verloren-

gegangene Teilungsfähigkeit aussagen . Eine Abnahme des Mitoseindex kann beruhen auf :

1. bei konstanter Mitosedauer einer Verlängerung der Generationszeit
2. bei konstanter Generationszeit (Interphasenzeit) einer Beschleunigung der Mitosedauer .

Die völlige Behinderung der Regeneration in vitro mit und ohne Stilbamidinzusatz spricht für eine Verminderung der Proliferation unter Kulturbedingungen, jedoch mit Vorbehalt , da mit derselben Technik in anderen Kulturansätzen von Plasmocytomknochenmark Mitosen vorkamen (BOLL , 8). Bei den Originalknochenmarkausstrichen K.L. und L.P. lagen die Mitoseindices der weißen Reihe im Bereich der Norm (MI : 11 -15%o) . Die Mitosen konnten gegenüber denen der roten Reihe gut abgegrenzt werden , da die Chromosomen der Plasmocytomzellen schlanker und länger sind .

Bei den vorhandenen Mitosen der Originalausstriche handelt es sich vorwiegend um Pro - und frühe Metaphasen, was dem Befund von BOLL an 291 Mitosen der 21 Fälle (pers. Mitteilung) entspricht . Die Verschiebung der Mitosephasen zu den frühen bedeutet nach BEGEMANN und HEMMERLE (4) eine kurzfristige Steigerung der Proliferation zur Zeit der Sternalpunktion .

Cytoplasmas hemmen , die als Enzym der Eiweißsynthese angesehen wird (16) , und damit auch die für das Zellwachstum notwendige Eiweißproduktion . Die Stoffwechselstörung , die sich aus der Verbindung der Ribonukleinsäure mit dem Stilbamidin ergibt , wird auf die Dauer gesehen auch die Proliferation der Plasmocytomzellen vermindern . Allerdings wird sich diese Proliferationshemmung wegen der geringen Proliferationsaktivität der Plasmocytomzellen erst nach längerer Zeit bemerkbar machen .

Eine direkte Wirkung des Stilbamidins auf die Lebensdauer der Plasmocytomzellen läßt sich mit der angewandten Technik nicht feststellen . Eine Erhöhung der Stilbamidinkonzentration auf das 10 - und 100 - fache vermehrt nicht die Degenerations - bzw. Reifungsvorgänge , aber fördert das Auftreten von inclusion bodies als Zeichen der aktiven Proteinsynthese . Mit diesen Untersuchungen in vitro konnte also festgestellt werden , daß die inclusion bodies durch direkte Reaktion des Stilbamidins mit der Plasmocytomzelle entstehen .

LITERATURVERZEICHNIS

1. ALBRECHT , M. und BOLL , I. :

Untersuchungen über die Einwirkung von Colchicin,
arseniger Säure , Stickstofflost und Äthylurethan
auf das menschliche Knochenmark in vitro

Ärztl. Wschr. 1950 , S. 485

2. APITZ , K.:

Die neuen Anschauungen vom Plasmocytom des Kno -
chenmarks , dem sog. multiplen Myelom

Kl. Wschr. 1940 , S. 1025

3. ASTALDI , G.:

zit. nach BOLL : pers. Mitteilung

4. BEGEMANN , H. und HEMMERLE , W.:

Die Mitosetätigkeit des menschlichen Knochenmarks
und ihre Beeinflussung durch cytostatische Substan -
zen

Kl. Wschr. 1949 , S. 530

5. BICHOWSKI , L.:

zit. nach GERHARTZ , H.: Habilitationsschrift 1958

6. BIESELE , J.J.:

zit. nach GERHARTZ, H.: Habilitationsschrift 1958

7. BOLL , I. :

Morphologische Studien zum Verhalten von Knochen -
markzellen in vitro III. Entstehung von 2-ker -
nigen Zellen

Fol. hämat. N.F. 3 , 84 1958

8. BOLL , I.:

Morphologische Veränderungen an einer Plasmocytomzelle während 4 Tagen in vitro

10. Dtsch. Hämat. Kongreß Tübingen 1964

9. BOLL , I. und FUCHS , G.:

Vereinfachtes Verfahren zur kurzfristigen Kultivierung von menschlichem Knochenmark in vitro

Blut Band VII 1961 , S. 252

10. BOLL ,I. und MEHL ,H.G.:

Phosphoraufnahme von Plasmocytom - und normalen Knochenmarkzellen in vitro

Kl. Wschr. 34 1956 ,S. 157

11. BRAUNSTEINER ,H., ~~HELLINGER~~ , K., PAKESCH , F. :

Elektronenmikroskopische Untersuchungen des Knochenmarks

Dtsch. Arch. klin. Med. 200 1953 ,S. 541

12. DRUCKREY ,H.:

Experimentelle Grundlagen der Chemotherapie des Krebses

Dtsch. Med. Wschr. 48 1952 ,S. 1495 ,1534

13. ESSER ,H.:

Über seltene Befunde beim Plasmocytom

Z.f. klin. Med. 146 , S. 535

14. FIESCHI ,A. und SACCHETTI ,C.:

Handbuch der gesamten Hämatologie von HEILMEYER,L.:

Verlag Urban & Schwarzenberg

15. FLEISCHHACKER ,H. :
Zur Behandlung von Plasmocytom mit Stilbamidin
Wien. Z. f. Inn. Med. 30 1949 , S. 377
16. FLIEDNER ,T.M.:
zit. nach BOLL ,I. : pers. Mitteilungen
17. GEMMIL ,C.L. :
zit. nach GERHARTZ ,H. : Habilitationsarbeit 1958
18. GERHARTZ ,H.:
Habilitationsarbeit 1958
19. GOLDECK ,H.:
Spezielle Therapie der Blutkrankheiten
Enke-Verlag Stuttgart 1955
20. GROSS ,R. und BOCK , H.F. :
Erkrankungen der Leucopoese
Kl. der Gegenw. Band X 1960 : S. 568
21. GUNZ , F.W. :
zit. nach GERHARTZ : Habilitationsschrift 1958
22. HEILMEYER , L.:
Handbuch der gesamten Hämatologie
Verlag Urban & Schwarzenberg
23. HEILMEYER , L. , MERK ,R. und PIRWITZ ,J. :
Beihefte zur Med. Mschr. Heft 4
Wiss. Verlagsgesellsch. Stuttgart 1948
24. HORSTER , J.A. und SANDKÜHLER , St. :
Klinische Erfahrungen mit Pentamidin und Stilb-
amidin
Z.Klin. Med. 146 1950 , S. 550

25. IVÉDY , GY. , PALDY , L., UNGER , G. :
Erfahrungen bei der Behandlung der interstitiellen, plasmacellulären Pneumonie mit Pentamidin
Mschr. Kinderkl. 1963 / 64 III , S. 297
26. JAEGER , E.:
Extramedulläres Myelom . Zur Diamidintherapie
des generalisierten Plasmocytoms
Med. Mschr. 4 1950 , S. 858
27. JAHN , D.:
Bedeutung der Radioisotope
Klinik der Gegenw. Band II 1956 , S. 551
28. v. JANCZO , H.:
zit. nach Pharmacology in medicine 1958
Second Edition
29. JESSERER , H.:
Osteopathien
Kl. der Gegenw. Band IX 1959 , S. 71
30. KOPAC , M.J. :
zit. nach HORSTER und SANDKÜHLER :
Z.klin. Med 146 1950 , S. 550
und TOMÉK : Wien. Kl. Wschr. 1951 , S. 892
31. KOPAC , M.J.:
zit. nach GERHARTZ; Habilitationsschrift 1958
32. LENNERT , K. und REMMELE , W. :
Karyometrische Untersuchungen
Act. hämatolog. 1958 (Basel) 19 ; S. 99
20 , S. 301

33. LETTRE¹, H.:
Chem. Beeinflussung von Zellwachstum und Teilung
Verh. dtsh. Gesellschaft in med. Kongreß 55
1949 ,S. 385
34. LETTRE¹, H., KRAPP ,R. und OCHSENSCHLÄGER ,M.:
Wirkungen des Colchicins und N-Methylcholic-
amids auf die Mitose der Zellen des Mäuseasci-
testumor
Z. Krebsforsch. 57 1950 , S. 142
35. LOURIE , EM. und YORKE,W.:
The trypanocid action of synthalin
Studies in chemotherapy XVI
ANN. Trop. Med. 31 1937 ,S. 435
36. ORMEROD ,WE . et al. :
Study of granules and ther changes in phasecon-
trast applarance produced by chemotherapeutic
agents in trypanosomes
Br.J. Pharmacolog. 21 1963 , S. 259
37. PROPP ,S.:
zit. nach TOMEK : Wien. Kl. Wschr. 1951, S,892
38. ROHR , K.:
Das menschliche Knochenmark
Thieme-Verlag Stuttgart 1960
39. SANDKÜHLER ,St.:
Klin. und elektrophoret. Beitrag zur Kenntnis der
Pathophysiologie des Plasmocytoms
Dtsch. Med. Wschr. 74 1949 ,S. 1563

40. SCHLAG ,H. und BOLL ,I.:
Untersuchungen über die Einwirkung von Teropterin
und Aminopterin auf das menschliche Knochenmark in
vitro
Z. Krebsforsch. 57 1951 ,S. 643
41. SCHMITZ ,H. :
Zur Beeinflussung des Zellstoffwechsels durch Al-
kaloide
Z. Krebsforsch. 57 1951 ,S. 405 ,463
42. SCHNEIDERBAUR ,A. und NARBESHUBER ,H.:
Die Bedeutung der Plasmocytose im Sternalmark bei
Lebercirrhosen
Wien. Med. Wschr. 17/18 1963 ,S. 370
43. SCHOEN ,R. und TISCHENDORF ,W.:
Klin. Pathologie der Blutkrankheiten
Thieme -Verlag Stuttgart 1950
44. SCHULTEN ,H. und PRIBILLA ,W.:
Tumorbehandlung mit cytostatischen Substanzen
Med. Kl. 1955 ,S. 1631
45. SNAPPER ,I.:
Stilbamidine and Pentamidine in Multiple Myeloma
JAMA 133 1947 ,S. 157
46. SNAPPER ,I.:
Treatment of Multiple Myeloma with Stilbamidine
JAMA 137 1948 ,S. 513
47. SNAPPER ,I. and SCHNEID , B.:
The development of Basophilic Inclusion Bodies
in Myeloma cells after Stilbamidine treatment
Ann. of int. med. Vol. 27 1947 ,S. 541

48. STOBBE ,H.:
Hämatologischer Atlas
Akademie-Verlag Berlin 1960
49. TOMEK ,S.:
Zur Stilbamidintherapie des Plasmocytoms
Wien. Kl. Wschr. 1951 ,S. 892
50. UNDRITZ :
zit. nach ROHR : Das menschliche Knochenmark 1960
51. VAQUEZ , J.J.:
Immunocytochemical study of Plasma cells in Multiple
Myeloma
J. lab. clin. med. 1958 51,S. 271
52. WALDENSTRÖM ,J.:
Vorkommen und Verlauf des Myeloms in einer Stadt-
bevölkerung
Med. Kl. 50 1964,S. 413
53. WALDEYER , UNNA :
zit. nach SCHNEIDERBAUR und NARBESHUBER
Wien. Med. Wschr. 17/18 1963 ,S. 370
54. WEIHSE ,H. und LOHSE,H.:
Plasmazellen bei Plasmocytom
Fol. hämat. N.F. 2 1958
55. WENZEL .E.:
Über Serumeiweißveränderungen bei einem Plasmocyc-
tom unter Stilbamidin
Z. Inn.Med. 1952 ,S. 141
56. WUHRMANN,F. und MÄRKI ,H.H.:
Dys- und Paraproteinämie , Schwabe-Verlag 1963
57. ZADEK ,I., WALLGREEN , SCHULTEN ,H.:
zit. nach STOBBE , Hämat. Atlas 1960

Frau Priv.-Doz. Dr. med. Irene Boll
danke ich für die freundliche Unter-
stützung der Arbeit sehr.

Lebenslauf

Am 5. Mai 1937 wurde ich als Tochter des Kaufmanns Karl - Heinz SCHULDT und seiner Ehefrau Irmgard, geb. Weltzien , in Rostock geboren .

1956 bestand ich an der Goethe - Oberschule in Rostock die Reifeprüfung mit " gut " .

Seit dem Sommer-Semester 1960 studierte ich an der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin . Die Naturwissenschaftliche Vorprüfung bestand ich am 18. März 1961 . Nach 5 Semestern Vorklinik legte ich im August 1962 das Physikum erfolgreich ab. Am 22. April 1966 bestand ich nach der klinischen Studienzeit von 6 Semestern an den Institutionen der Freien Universität Berlin das Staatsexamen .

Während des klinischen Studiums famulierte ich auf der Internen Abteilung des Krankenhauses des Ev. Johannesstiftes Berlin- Spandau bei Herrn Chefarzt Dr. Neubert , auf der Chirurgie im Martin - Luther -Krankenhaus bei Herrn Prof. Domrich , auf der Chirurgie im Münchener Krankenhaus r.d. Isar bei Herrn Prof. Maurer sowie im Institut für Tuberkulose in Beograd und im Sanatorium für Tuberkulose in Nisch/Jugoslawien.

Berlin, den 8.5. 1966

